

Rec'd PCT/PTO 18 OCT 2004
10/511629

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/04812

16.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

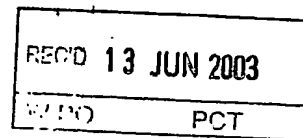
2002年 4月17日

出 願 番 号
Application Number:

特願2002-115201

[ST.10/C]:

[JP2002-115201]



出 願 人
Applicant(s):

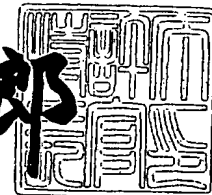
大塚製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3038847

【書類名】 特許願

【整理番号】 26502JP

【提出日】 平成14年 4月17日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 5/06

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県松戸市小金 3 1 6

【氏名】 梅澤 明弘

【発明者】

【住所又は居所】 東京都西東京市ひばりが丘北 2 - 1 - 3

【氏名】 伊澤 良兼

【特許出願人】

【識別番号】 000206956

【氏名又は名称】 大塚製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100065215

【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-6203-0941

【選任した代理人】

【識別番号】 100076510

【弁理士】

【氏名又は名称】 掛樋 悠路

【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志

【選任した代理人】

【識別番号】 100090066

【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司

【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【弁理士】

【氏名又は名称】 館 泰光

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 睦子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9708032

特 2 0 0 2 - 1 1 5 2 0 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物由来の間葉系細胞を以下の工程に付すことを特徴とする、間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法：

- a) 哺乳動物の検体から得られる膵β細胞に分化し得る間葉系細胞を増殖させる工程、
- b) 哺乳動物の検体から得られる間葉系細胞または工程a)で得られる間葉系細胞から、細胞膜抗原に結合性を有する抗体を用いて膵β細胞に分化し得る間葉系細胞を選択して分離する工程、
- c) 工程a)またはb)で得られる膵β細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞を、該細胞が接触可能なように接着分子/細胞外基質をコートした反応容器中で培養する工程。
- d) 工程a)、b)またはc)で得られる膵β細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞を膵β細胞形成剤と接触させて培養する工程、および
- e) 工程c)またはd)で得られる膵β細胞を、該膵β細胞で特異的に発現する遺伝子を選択マーカーとして選択して分離する工程。

【請求項2】 間葉系細胞が、骨髓、皮下組織、子宮内膜、血液、臍帯血、胎盤から得られる、請求項1に記載の間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。

【請求項3】 工程b)における間葉系細胞の選択が、CD140陽性抗体を用いて行われる請求項1または2に記載の間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。

【請求項4】 工程e)における膵β細胞に特異的に発現する遺伝子が、インスリンである請求項1から3のいずれかに記載の間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。

【請求項5】 工程d)における膵β細胞形成剤が、サイトカイン、生理活性物質、転写因子および接着分子/細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項1から4のいずれかに記載の間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。

【請求項6】 サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、繊維芽細胞増殖因子(b

FGF)/FGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合EGF、ガストリン、TGF- β 、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen)、グルカゴン様ペプチド1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4およびKGF(karatinocyte growth factor)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項5に記載の間葉系細胞を脾 β 細胞に形成させる方法。

【請求項7】生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビンA、プロゲステロン、プトレシン(Putrecine)およびセレンウム(Selenium)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項5に記載の間葉系細胞を脾 β 細胞に形成させる方法。

【請求項8】転写因子が、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、PAX-6、PAX-4、Hlxb-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1 α 、HNF1 β およびHNF4 α からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項5に記載の間葉系細胞を脾 β 細胞に形成させる方法。

【請求項9】接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィブロネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項5に記載の間葉系細胞を脾 β 細胞に形成させる方法。

【請求項10】サイトカイン、生理活性物質、転写因子および接着分子/細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する、請求項1から9のいずれかに記載の方法に用いられる脾 β 細胞形成剤。

【請求項11】サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、繊維芽細胞増殖因子(bFGF)/FGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合EGF、ガストリン、TGF- β 、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen)、グルカゴン様ペプチド1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4およびKGFからなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項10に記載の脾 β 細胞形成剤。

【請求項12】生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビ

ンA、プロゲステロン、プトレシン(Putrecine)およびセレンウム(Selenium)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項10に記載の膵β細胞形成剤。

【請求項13】転写因子が、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、PAX-6、PAX-4、Hlx-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1α、HNF1βおよびHNF4αからなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項10に記載の膵β細胞形成剤。

【請求項14】接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィブロネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項10に記載の膵β細胞形成剤。

【請求項15】候補物質の存在下に請求項1に記載の方法に従って間葉系細胞から膵β細胞を形成させ、候補物質の非存在下に形成される膵β細胞と対比して、膵β細胞の形成を促進させる作用を奏する候補物質を選択することを特徴とする、間葉系細胞からのβ細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項16】間葉系細胞が、骨髓、皮下組織、子宮内膜、血液、臍帯血、胎盤から得られる、請求項15に記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項17】工程b)における間葉系細胞の選択が、CD140陽性抗体を用いて行われる請求項15または16に記載の間葉系細胞からのβ細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項18】工程e)における膵β細胞に特異的に発現する遺伝子が、インスリンである請求項15から17のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項19】工程d)における膵β細胞形成剤が、サイトカイン、生理活性物質、転写因子および接着分子/細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項15から18のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項20】サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、繊維芽細胞増殖因子(bFGF)/FGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合EGF、ガストリン

、TGF- β 、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen)、グルカゴン様ペプチド1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4およびKGFからなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項19に記載の間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項21】生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビンA、プロゲステロン、プトレシン(Putrecine)およびセレンウム(Selenium)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項19に記載の間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項22】転写因子が、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、PAX-6、PAX-4、Hlxb-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1 α 、HNF1 β およびHNF4 α からなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項19に記載の間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項23】接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィブロネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、請求項19に記載の間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【請求項24】候補物質が培養組成物である請求項15から23のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する候補物質のスクリーニング方法。

【請求項25】請求項15から24のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する候補物質のスクリーニング方法によって得られる、間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する活性を有する物質。

【請求項26】請求項1から9のいずれかに記載の方法によって得られる膵 β 細胞の有効量を患者に投与する、耐糖能異常に基づく疾患を有する患者の疾患を治療する方法。

【請求項27】請求項1から9のいずれかに記載の方法によって得られる膵 β 細胞を有効成分として含有する、耐糖能異常に基づく疾患の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、間葉系細胞から膵β細胞を形成させる方法に関する。また本発明は、間葉系細胞から膵β細胞を形成させる膵β細胞形成剤に関する。さらに本発明は、間葉系細胞からの膵β細胞形成を促進させる候補物質のスクリーニング方法に関する。加えて本発明は、間葉系細胞から膵β細胞を形成させる方法によって得られる膵β細胞を利用する耐糖能異常疾患の治療方法および該方法のための治療剤に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

膵β細胞は、胎児期ではインスリンを産生しながら活発に細胞分裂を行っているが、炎症、出生後の加齢(老化)などに伴い次第に変性壊死する。従って、これらの患者などの生体内に残存する膵β細胞数は少なく、これが血糖インスリン値の低下や耐糖能異常を招く。

【 0 0 0 3 】

かかる炎症などによる膵β細胞の変性壊死に伴われる耐糖能異常疾患は、これまでインスリン投与の増強などの対症療法を中心に治療が行われてきた。これに対して、膵β細胞移植は、重症耐糖能異常疾患に対する根本的な治療法と考えられるが、臓器提供者の不足、脳死判定の難しさ、拒絶反応、医療費の高騰などの問題から、一般的な医療に普及するには至っていない。実際、糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患は、腎障害、神経障害、網膜障害、虚血性心疾患、高血圧などの重大なリスクファクターであり、失われた膵β細胞を再生することができれば、医療福祉の大きな前進につながると考えられる。

【 0 0 0 4 】

現在までに、膵β細胞の性質を保存した細胞株としては、insulinoma細胞およびRIN細胞が知られている [Clark, S.A., et al., Diabetes, 46 (10), 1663 (1997)]。しかしながら、これらの細胞の移植によると腫瘍が形成されるため、これらの細胞は細胞移植に適さない問題がある。このような背景のもと、膵β細胞を再構築するために以下の3つの方法が考えられた。

【0005】

1つ目の方法は、膵 β 細胞以外の細胞を膵 β 細胞に変換する方法である。この方法は、例えば肝細胞にpdx-1を導入すると β 細胞様細胞に変換されることから類推された[Nature Med, 6 (5): 568, 2001]。

【0006】

2つ目の方法は、膵 β 細胞に再び分裂能を付与する方法である。これは、胎児期に β 細胞が分裂する現象および切除膵において β 細胞が分裂する現象に基づいている。

【0007】

3つ目の方法は、未分化な幹細胞から膵 β 細胞を誘導する方法である。すでに、胚性幹細胞(ES細胞)から膵 β 細胞を誘導できることが知られている[Science, 292: 1389-1393, 2001; Diabetes, 49: 157-162, 2000; Diabetes, 50: 1691-1697, 2001]。しかるに、このES細胞は、これを生体に移植するとカルシノーマを形成する欠点があり、また抗原性などの問題が存在する。また、成人の膵ラ氏島に存在する幹細胞から膵 β 細胞を誘導する方法も知られている[Diabetes, 50: 521-533, 2001]。

【0008】

上記のようなES細胞を現実の医療に応用するためには、少なくとも膵 β 細胞前駆細胞あるいは膵 β 細胞を純粋に精製する技術が不可欠である。抗原性の問題はクローン化の技術により解決できる可能性が示唆されるが、煩雑な操作を必要とすることから、一般的な医療への応用は容易ではない。

【0009】

未分化な細胞である膵 β 細胞前駆細胞を取得して移植に用いる方法も考えられ、動物を用いた実験では膵 β 細胞として有効に機能することが報告されている[Ramiya, V.K., et al., Nat. Med., 6(3), 278(2000); Soria, B., et al., Diabetes, 49(2), 157 (2000)]。該報告は患者自身から骨髓液を取得して、in vitroで細胞培養および薬剤処理を行った後、膵 β 細胞の障害部位に移植する細胞治療が現実的な医療として可能になることを示唆している。

【0010】

成体骨髄には、造血系幹細胞および血管幹細胞以外に、間葉系幹細胞が存在し、該間葉系幹細胞からは骨細胞、軟骨細胞、腱細胞、靱帯細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、間質細胞、肝臓oval細胞が分化誘導できることが報告されている [Science, 284, 143-147 (1999); Science, 284, 1168-1170 (1999)]。

【 0 0 1 1 】

生体内の組織から目的の細胞を取得する方法としては、目的細胞に特有の各種表面抗原を認識する抗体を用いる方法が知られている。上記細胞特有の表面抗原については、現在、以下の知見が得られている。即ち、例えば未熟な造血幹細胞は、CD34+/CD38-/HLA-DR-/CD90(Thy-1)+の特性を有しており、該造血幹細胞が分化するに従い、CD38が発現し、CD90(Thy-1)が消失する [蛋白質核酸酵素Vol. 45, No. 13, 2056-2062(2000)]。血管内皮細胞は、CD34、CD31、Flk-1、Tie-2、E-セレクトリンなどのマーカーを発現しており [分子心血管病, Vol. 1, No. 3, 294-302 (2000)]、骨髄の間葉系幹細胞は、CD90、CD105、CD140などのマーカーを発現している [Science, 284, 143-147 (1999); Science, 284, 1168-1170 (1999)]。しかしながら、膵β細胞を誘導できる間葉系幹細胞に関して、上記のような特有の表面マーカーは現在尚明らかにされていない。

【 0 0 1 2 】

【発明が解決しようとする課題】

以上のように、糖尿病などの耐糖能異常疾患の治療をより安全かつ確実に行い得る技術、特に、安全に移植可能な膵β細胞の確立乃至膵β細胞の再生技術、これらに付随する膵β細胞の増殖、分化の制御技術、該制御のためのサイトカイン乃至転写因子の解明、同定などが、当業界で望まれている。

【 0 0 1 3 】

本発明者は、上記のように当業界で望まれている耐糖能異常疾患の治療に有効な新しい技術を提供することを目的として鋭意研究を重ねる過程において、以下の知見を得た。

【 0 0 1 4 】

すなわち、マウス骨髄由来の間葉系細胞を1細胞レベルにまず分離して、膵β細胞形成能を有する細胞株を複数取得した。次に、得られた細胞株を、GFP(Gree

n Fluorescent Protein)を発現するレトロウイルスベクターを用いて標識し、1つの細胞を蛍光顕微鏡下で追跡することによって、該間葉系細胞が、腓β細胞および神経細胞の少なくとも2種の異なる細胞に分化誘導できる多分化能(Pluripotent)を有する幹細胞であることを見出した。さらに、該幹細胞が、確率的(stochastic)に腓β細胞および神経細胞の系列に分化することを見出すと共に、この分化に参与する分化誘導剤(腓β細胞形成剤)としての転写因子、液性因子およびマトリックスを明らかにした。次に、移植実験により、上記間葉系細胞が骨、軟骨、脂肪、心筋、骨格筋、神経および血管になることを確認した。これらの結果から、本発明者は、上記間葉系細胞が、今まで知られていた骨髓に存在する造血系組織にのみ分化する造血幹細胞および骨格筋、脂肪細胞、骨などの沿軸中胚葉系組織にのみ分化する間葉系幹細胞とは異なって、外胚葉系、中胚葉系および内胚葉系の3胚葉のすべてに分化できる全能性を有していることを見出した。

【0015】

また、本発明者は、上記間葉系細胞について、造血系細胞の表面抗原であるCD34、CD117、CD14、CD45、CD90、Sca-1、Ly6cおよびLy6gを認識する抗体、血管内皮細胞の表面抗原であるFlk-1、CD31、CD105およびCD144を認識する抗体、間葉系細胞の表面抗原であるCD140を認識する抗体、インテグリンの表面抗原であるCD49b、CD49d、CD29およびCD41を認識する抗体、マトリックス受容体であるCD54、CD102、CD106およびCD44を認識する抗体などを用いて、表面抗原の発現を解析した結果、該間葉系細胞は今までに知られていない新しい発現形態を示す腓β細胞に分化し得る細胞であることを見出した。本発明は、これらの知見を基礎として完成されたものである。

【0016】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の項1-項27を提供する。

【0017】

項1.哺乳動物由来の間葉系細胞を以下の工程に付すことを特徴とする、間葉系細胞から腓β細胞を形成する方法：

a)哺乳動物の検体から得られる腓β細胞に分化し得る間葉系細胞を増殖させる工

程、

b) 哺乳動物の検体から得られる間葉系細胞または工程a)で得られる間葉系細胞から、細胞膜抗原に結合性を有する抗体を用いて脾β細胞に分化し得る間葉系細胞を選択して分離する工程、

c) 工程a)またはb)で得られる脾β細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞を、該細胞が接触可能なように接着分子/細胞外基質をコートした反応容器中で培養する工程。

d) 工程a)、b)またはc)で得られる脾β細胞に分化し得る間葉系細胞またはこれを含む細胞を脾β細胞形成剤と接触させて培養する工程、および

e) 工程c)またはd)で得られる脾β細胞を、該脾β細胞で特異的に発現する遺伝子を選択マーカーとして選択して分離する工程。

【 0 0 1 8 】

項2. 間葉系細胞が、骨髓、皮下組織、子宮内膜、血液、臍帯血、胎盤から得られる、項1に記載の間葉系細胞から脾β細胞を形成する方法。

【 0 0 1 9 】

項3. 工程b)における間葉系細胞の選択が、CD140陽性抗体を用いて行われる項1または2に記載の間葉系細胞から脾β細胞を形成する方法。

【 0 0 2 0 】

項4. 工程e)における脾β細胞に特異的に発現する遺伝子が、インスリンである項1-3のいずれかに記載の間葉系細胞から脾β細胞を形成する方法。

【 0 0 2 1 】

項5. 工程d)における脾β細胞形成剤が、サイトカイン、生理活性物質、転写因子および接着分子/細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種である項1-4のいずれかに記載の間葉系細胞から脾β細胞を形成する方法。

【 0 0 2 2 】

項6. サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、繊維芽細胞増殖因子(bFGF)/EGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合EGF、ガストリン、TGF-β、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Pla

cental lactogen)、グルカゴン様ペプチド1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4およびKGF(keratinocyte growth factor)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項5に記載の間葉系細胞を膵 β 細胞に形成させる方法。

【0023】

項7.生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビンA、プロゲストロン、プトレシン(Putrecine)およびセレンウム(Selenium)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項5に記載の間葉系細胞を膵 β 細胞に形成させる方法。

【0024】

項8.転写因子が、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、PAX-6、PAX-4、Hlx-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1 α 、HNF1 β およびHNF4 α からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項5に記載の間葉系細胞を膵 β 細胞に形成させる方法。

【0025】

項9.接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィブロネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、項5に記載の間葉系細胞を膵 β 細胞に形成させる方法。

【0026】

項10.サイトカイン、生理活性物質、転写因子および接着分子/細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種を有効成分として含有する、項1-9のいずれかに記載の方法に用いられる膵 β 細胞形成剤。

【0027】

項11.サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、繊維芽細胞増殖因子(bFGF)/FGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合EGF、ガストリン、TGF- β 、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen)、グルカゴン様ペプチド1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4およびKGF(keratinocyte growth factor)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項10に記載の膵 β 細胞形成剤。

【0028】

項12.生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビンA、プロゲストロン、プトレシン(Putrecine)およびセレンウム(Selenium)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項10に記載の膵 β 細胞形成剤。

【0029】

項13.転写因子が、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、PAX-6、PAX-4、Hlxb-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1 α 、HNF1 β およびHNF4 α からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項10に記載の膵 β 細胞形成剤。

【0030】

項14.接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィブロネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、項10に記載の膵 β 細胞形成剤。

【0031】

項15.候補物質の存在下に項1に記載の方法に従って間葉系細胞から膵 β 細胞を形成させ、候補物質の非存在下に形成される膵 β 細胞と対比して、膵 β 細胞の形成を促進させる作用を奏する候補物質を選択することを特徴とする、間葉系細胞からの β 細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【0032】

項16.間葉系細胞が、骨髓、皮下組織、子宮内膜、血液、臍帯血、胎盤から得られる、項15に記載の間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【0033】

項17.工程b)における間葉系細胞の選択が、CD140陽性抗体を用いて行われる項15または16に記載の間葉系細胞からの β 細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【0034】

項18.工程e)における膵 β 細胞に特異的に発現する遺伝子が、インスリンである項15から17のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【0035】

項19.工程d)における膵β細胞形成剤が、サイトカイン、生理活性物質、転写因子および接着分子/細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種である項15-18のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【0036】

項20.サイトカインが、肝細胞成長因子(HGF)、繊維芽細胞増殖因子(bFGF)/FGF-2、インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合EGF、ガストリン、TGF-β、インスリン様成長因子(IGF-1)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen)、グルカゴン様ペプチド1(Glucagon like peptide-1)、Exendin-4およびKGF(keratinocyte growth factor)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項19に記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【0037】

項21.生理活性物質が、ニコチンアミド、ベータセルリン、アクチビンA、プロゲストロン、プトレシン(Putrecine)およびセレンウム(Selenium)からなる群から選ばれる少なくともひとつである、項19に記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【0038】

項22.転写因子が、Isl-1、Pdx-1/IPF-1、Beta2/neuroD、ngn3、PAX-6、PAX-4、Hlx-9、Nkx2.2、Nkx6.1、HNF1α、HNF1βおよびHNF4αからなる群から選ばれる少なくともひとつである、項19に記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【0039】

項23.接着分子/細胞外基質が、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、アガロース、フィブロネクチンおよびオルニチンからなる群から選ばれる少なくともひとつである、項19に記載の間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補物質をスクリーニングする方法。

【 0 0 4 0 】

項24.候補物質が培養組成物である項15-23のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する候補物質のスクリーニング方法。

【 0 0 4 1 】

項25.項15-24のいずれかに記載の間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する候補物質のスクリーニング方法によって得られる、間葉系細胞からの膵 β 細胞の形成を促進する活性を有する物質。

【 0 0 4 2 】

項26.項1-9のいずれかに記載の方法によって得られる膵 β 細胞の有効量を患者に投与する、耐糖能異常に基づく疾患を有する患者の疾患を治療する方法。

【 0 0 4 3 】

項27.項1-9のいずれかに記載の方法によって得られる膵 β 細胞を有効成分として含有する、耐糖能異常に基づく疾患の治療剤。

【 0 0 4 4 】

本発明の間葉系細胞から膵 β 細胞を形成する方法は、前述した通り、哺乳動物由来の間葉系細胞（膵 β 細胞に分化し得る間葉系細胞を含む）を起源として、基本的には、該細胞を膵 β 細胞に分化させた後（工程cまたはd）、得られる膵 β 細胞を分離（採取）する（工程e）ことにより実施できる。

【 0 0 4 5 】

上記において起源とする間葉系細胞は、これを一般的方法に従い増殖させることができ（工程a）、また該細胞より膵 β 細胞に分化する能力を有する所望の間葉系細胞を選択、分離することができる（工程b）。

【 0 0 4 6 】

かくして得られる膵 β 細胞への分化能を有する細胞は、接着分子/細胞外基質（膵 β 形成剤）をコートした反応容器中で培養する（工程c）かまたは膵 β 細胞形成剤と接触させて培養（膵 β 形成剤を含む培地で培養）する（工程d）ことによって目的とする膵 β 細胞に分化誘導される。

【 0 0 4 7 】

本発明方法の好ましい一実施態様によれば、起源とする間葉系細胞を増殖させ

(工程a)、次いで該細胞中に存在する脾β細胞に分化し得る間葉系細胞を選択分離し(工程b)、この選択分離された間葉系細胞を培養して脾β細胞を形成(分化誘導)させ(工程cおよび/または工程d)、最終的に得られる脾β細胞を選択分離する(工程e)。

【0048】

上記脾β細胞の形成(分化誘導)は、特に好ましくは、工程cおよびこれに引き続く工程dの採用によって行われる。

【0049】

本発明方法において、哺乳動物由来の間葉系細胞(脾β細胞への分化能を有する間葉系細胞を含む)は、例えば骨髓、筋肉、能、脾臓、肝臓、腎臓、皮下組織、子宮内膜、血液、臍帯血などの生体組織または胎盤から単離することができ、好ましくは骨髓または臍帯血から単離される。

【0050】

上記間葉系細胞は、多分化能幹細胞であり、脾β細胞に分化する能力の他にも各種細胞(生体組織の全細胞)に分化する能力を潜在的に有している。

【0051】

本発明方法に好ましく利用できる脾β細胞への分化能を有する間葉系細胞は、細胞表面マーカーの発現型解析の結果、CD140陽性であることが確認された。該CD140陽性細胞には、更にCD34陽性およびCD117陽性である細胞、およびCD34陰性およびCD117陽性である細胞が含まれる。これらの内でも特に好ましい細胞としては、

- (1)CD34陽性、CD117陽性、CD14陰性、CD45陰性、CD90陰性、Flk-1陰性、CD31陰性、CD105陰性、CD144陽性、CD140陽性、CD49b陰性、CD49d陰性、CD29陽性、CD54陰性、CD102陰性、CD106陰性およびCD44陽性である細胞；
- (2)CD34陽性、CD117陽性、CD14陰性、CD45陰性、CD90陰性、Flk-1陰性、CD31陰性、CD105陰性、CD144陰性、CD140陽性、CD49b陰性、CD49d陰性、CD29陽性、CD54陰性、CD102陰性、CD106陰性およびCD44陽性である細胞；
- (3)CD34陰性、CD117陽性、CD14陰性、CD45陰性、CD90陰性、Flk-1陰性、CD31陰性、CD105陰性、CD144陽性、CD140陽性、CD49b陰性、CD49d陰性、CD29陽性、CD54陰性、CD102陰性、CD106陰性およびCD44陽性である細胞；

グにより培養液中に浮遊させる。かくして得られる骨髓液から、前述したヒト骨髓液からの骨髓由来間葉系細胞の単離方法と同様にして、脾β細胞への分化能を有するラットまたはマウス由来の骨髓由来間葉系細胞を単離することができる。

【0059】

(2) 骨髓以外の組織からの脾β細胞への分化能を有する細胞の単離

骨髓以外の組織から、後述する12.に記載の抗体を用いた分離方法により、脾β細胞への分化能を有する細胞を取得することができる。

【0060】

骨髓以外の組織としては、好ましくは臍帯血があげられる。この臍帯血からの脾β細胞への分化能を有する細胞の単離は、具体的には以下の方法に従うことができる。

【0061】

即ち、まず臍帯から臍帯血を分取し、直ちに500units/mlの終濃度になるようにヘパリンを加える。よく混合した後、遠心分離して臍帯血から細胞を分取し、10%のFBSを含むα-MEM、DMEM、IMDMなどの細胞培養用培地に再浮遊させる。得られた細胞液から後述する抗体を利用して、脾β細胞への分化能を有する細胞を分離することができる。

【0062】

2. 脾β細胞への分化能を有する細胞の培養

脾β細胞への分化能を有する間葉系細胞の培養は、適当な培地中で行われる。該培地としては、通常公知(例えば、組織培養の技術基礎編 第三版、朝倉書店、1996年参照)の組成を有する細胞培養用培地を用いることができる。培養条件としては、細胞が培養可能ないかなる条件でもよい。一般に、培養温度は33-37℃が好ましい。培養は、通常好ましくは、5-10%の二酸化炭素ガスを満たしたインキュベーター内で実施される。

【0063】

脾β細胞への分化能を有する骨髓由来間葉系細胞は、通常の組織培養用のプラスチック製培養皿に接着させて増殖させるのが好ましい。細胞が培養皿一面に増殖する頃、培地を除去し、トリプシン-EDTA溶液を加えて細胞を浮遊させる。浮

遊した細胞を、PBSもしくは細胞培養用培地で洗浄後、細胞培養用培地で5-20倍に希釈し、新しい培養皿に添加して、さらに継代培養する。

【 0 0 6 4 】

3. 膵β細胞への分化能を有する細胞から膵β細胞の形成

上記2に示す膵β細胞への分化能を有する間葉系細胞の培養によって、該間葉系細胞の増殖と共に、該間葉系細胞の分化による膵β細胞の形成が行われる。

【 0 0 6 5 】

膵β細胞への分化能を有する細胞からの膵β細胞の形成は、より好ましくは、膵β細胞形成剤として、(1)胎児の膵β細胞発生領域で発現している因子または胎児の膵β細胞発生段階において膵β細胞への分化に働く因子、および/または(2)膵β細胞への分化能を有する細胞の培養上清または該細胞から分化した膵β細胞の培養上清を利用して実施することができる。

【 0 0 6 6 】

上記(1)として記載の胎児の膵β細胞発生領域で発現している因子または胎児の膵β細胞発生段階において膵β細胞への分化に働く因子としては、サイトカイン、接着分子/細胞外基質、生理活性物質、転写因子などをあげることができる。これらの膵β細胞形成剤は、一般には、膵β細胞への分化能を有する細胞の培養系内にこれらの適量を添加存在させることによって利用される。その添加量は、膵β形成剤の種類に応じて適宜決定でき、特に限定的ではないが、一般には、約1-400ng/ml培養液の範囲とすることができる。

【 0 0 6 7 】

サイトカインとしては、膵β細胞への分化能を有する細胞に、膵β細胞の発生段階で膵β細胞への分化を促進する作用を有するものであればいかなるサイトカインでもよい。好ましいサイトカインの具体例としては、肝細胞増殖因子(HGF, Hepatocyte growth factor, NATURE MEDICINE, VOL.6, NUMBER 3, MARCH 2000, 278-282, V. K. Ramiya, et al.; DIABETES, VOL.48, 1999, 1013-1019, Beat tie, G. M., et al.; EDNOCRINOLOGY, VOL.137, NO.9, 3969-3976, Hiroso M ashima, et al.; THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL.275, NO.2, 14 January 2000; 1226-1232, Adolfo Garcia-Ocana, et al.,など参照)、繊維芽細

胞増殖因子(basic fibroblast growth factor (bFGF), FGF-2(SCIENCE, VOL.284, 18, JUNE 1999, 1998-2003, Joonil Jung et al.; NATURE, VOL.408, 14 DECEMBER 2000, 864-868, Alan W.Hart et al.など参照), FGF-1(SCIENCE, VOL. 284, 18, JUNE 1999, 1998-2003, Joonil Jung et al.; NATURE, VOL.408, 14 DECEMBER 2000, 864-868, Alan W. Hart et al.など参照)), インスリン、トランスフェリン、ヘパリン結合EGF(heparin-binding epidermal growth factor, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL.272, NO.46, 14 NOVEMBER, 1997, 29137-29143, Hideaki Kaneto et al.参照)、EGF(DEVELOPMENT, VOL.112, 1991, 855-861, Hiroyuki Nogawa and Yu Takahashi; NATURE MEDICINE, VOL.6, NUMBER 3, MARCH 2000, 278-282, V. K. Ramiya et al.など参照)、ガストリン、TGF- β 1(DEVELOPMENT, VOL.120, 1994, 3451-3462, Sanvito F. et al.参照)、インスリン様成長因子(IGF-1など)、パラサイロイド・ホルモン関連蛋白(PTHrP, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL.271, NO.2, 12 January 1996, 1200-1208, Rupangi C.Vasavada et al.参照)、成長ホルモン(growth hormone)、プロラクチン、プラセンタル・ラクトジェン(Placental lactogen, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL.275, NO.20, 19 May 2000, 15399-15406, Rupangi C.Vasavada et al.参照)、グルカゴン様ペプチド1(Glucagon like peptide-1, DIABETES, VOL.49, MAY 2000, 741-748, Doris A.Stoffers et al.; DIABETES, VOL.50, APRIL 2001, 785-796, Hongxiang Hui et al.など参照)、Exendin-4(DIABETES, VOL.48, DECEMBER, 1999, 2270-2276, Gang Xu et al.; DIABETES, VOL.49, MAY 2000, 741-748, Doris A.Stoffers et al.など参照)、KGF (keratinocyte growth factor, ケラチン細胞増殖因子、PNAS, VOL.97, NO.14, 5 JULY 2000, 7999-8004, Susan Bonner-Weir et al.; AM. J. PATHOL., VOL.145, 1994, 80-85, Yi E. et al.など参照)、TGA α (DEVELOPMENT, VOL.112, 1991, 855-861, Hiroyuki Nogawa and Yu Takahashi)などを挙げることができる。

【0068】

また、膵 β 細胞への分化を抑制するサイトカインに対する阻害剤を用いることにより、膵 β 細胞への分化能を有する細胞に、膵 β 細胞の発生段階で膵 β 細胞への分化を促進することも可能である。このような抑制するサイトカインとしては

、繊維芽細胞増殖因子2(FGF-2)などを例示でき、その阻害剤としては例えば該サイトカインを中和する抗体、低分子化合物などが知られている。

【0069】

接着分子/細胞外基質としては、膵β細胞の発生段階で膵β細胞発生領域で発現している各種の接着分子/細胞外基質を利用することができる。その具体例としては、例えばゼラチン、ラミニン(DIABETES, VOL.49, JUNE 2000, 936-944, Christopher A. Crisera et al.; DIABETES, VOL.48, APRIL 1999, 722-730, Fang-Xu Jiang et al.; J. Anat. VOL. 193, 1998, 1-21, Monique Aumailley and Neil Smyth)、コラーゲン(DIABETES, VOL.45, AUGUST 1996, 1108-1114, Julie Kerr-Conte et al.; CELL TISSUE RES, VOL.277, 1994, 115-121, Deijnen JH van et al.; J TISSUE CULT Method, VOL.8, 1983, 31-36, Richards J et al.)、アガロース、フィブロネクチン、オルニチンなどの細胞外マトリックス蛋白質などを挙げるることができる。例えば、ラミニンを利用する場合、該ラミニンでコートした培養皿で膵β細胞への分化能を有する細胞を培養すればよく、これによって該細胞の膵β細胞への分化を促進することができる。

【0070】

生理活性物質としては、ニコチンアミド(NATURE MEDICINE, VOL.6, NUMBER 3, MARCH 2000, 278-282, V.K.Ramiya et al.; TRANSPLANTATION, VOL.68, NO.11, 15 DECEMBER 1999, 1674-1683, Timo Otonkoski et al.参照)、ベータセルリン(BETACELLULIN, DIABETES, VOL.48, FEBRUARY 1999, 304-309, Hirosato Mashima et al.参照)、アクチビンA、プロゲステロン、プトレシン(Putrecine)、セレンウム(Selenium)、B27-Supplemented Nuerobasal(Journal of Nueroscience Research, VOL.35, 1993, 567-576, G. J. Brewer et al.)などの膵β細胞への分化能を有する細胞に、膵β細胞の発生段階で膵β細胞への分化を促進する作用を奏し得るものを挙げるることができる。例えばニコチンアミドは、1-10mMの濃度で用いられる。他のものも、同様に所望の分化促進作用を奏し得る濃度で利用することができる。

【0071】

転写因子としては、Isl-1 (NATURE, VOL.385, 16 JANUARY 1997, 257-260, U1

f Ahlgren et al.), Pdx-1/IPF-1 (NATURE, VOL.371, 13 OCTOBER 1994, 606-609, Joorgen Jonsson et al.; NATURE GENETICS, VOL.15, JANUARY 1997, 106-110, Doris A.Stoffers et al.; NATURE, VOL.408, 14 DECEMBER 2000, 864-868, Alan W.Hart et al.), Beta2/neuroD (GENES & DEVELOPMENT VOL.11, 1997, 2323-2334, Francisco J.Naya et al.), ngn3 (DEVELOPMENT, VOL.127, 3533-3542, 2000, Valeire M.Schwitzgebel et al.), PAX-6 (NATURE, VOL.387, 22 MAY 1997, 406-409, Luc St-Onge et al.), PAX-4 (MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, VOL.19, NO.12, DECEMBER 1999, 8281-8291, Yoshio Fujitani et al.; MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, VOL.19, NO.12, DECEMBER 1999, 8272-8280, Stuart B.Smith et al.), Hlxb-9 (NATURE GENETICS, VOL.23, SEPTEMBER 1999, 67-70, Hao Li et al.; NATURE GENETICS, VOL.23, SEPTEMBER 1999, 71-75, Kathleen A.Harrison et al.), Nkx2.2(DEVELOPMENT, VOL.125, 2213-2221, 1998, L.Sussel et al.), Nkx6.1(J. Histochem Cytochem, VOL.46, 1998, 707-715, Oster A. Jensen et al.), HNF1 α , HNF1 β および HNF4 α (NATURE CELL BIOLOGY, VOL.2, DECEMBER 2000, 879-887, Chia-Ning Shen et al.), Cyclopamine, HNF3 β , HNF6などをあげることができる。

【 0 0 7 2 】

上述した転写因子は、該因子をコードするDNAを膵 β 細胞への分化能を有する細胞中に導入して、発現させることにより、膵 β 細胞への分化を誘導させることができる。かかる転写因子をコードするDNAの細胞への導入および発現方法は、常法に従うことができる。

【 0 0 7 3 】

また、膵 β 細胞から取得した細胞外基質も、膵 β 細胞形成剤として利用することができる。該細胞外基質は、膵 β 細胞への分化能を有する細胞の培養上清または該細胞から分化した膵 β 細胞の培養上清中に存在していることから、これらの培養上清の利用によっても膵 β 細胞への分化能を有する細胞から膵 β 細胞を誘導することができる。

【 0 0 7 4 】

例えば、膵 β 細胞由来細胞外基質は、これをコートした細胞培養用培養皿にて

所望細胞を培養するか、これを生成する膵β細胞と所望細胞とを共培養するか、或いはこれを含む培養上清を培養培地に添加して所望細胞を培養することによって、膵β細胞への分化能を有する細胞を膵β細胞に分化誘導させることができる。

【 0 0 7 5 】

また、後記4.に示す方法で得られる膵β細胞分化誘導因子も膵β細胞形成剤として利用することができ、この利用によっても、膵β細胞への分化能を有する細胞を膵β細胞に分化誘導することができる。

【 0 0 7 6 】

4. 膵β細胞分化誘導因子の取得

膵β細胞分化誘導因子の取得方法としては、インスリンを産生する細胞の培養上清に、各種プロテアーゼ阻害剤を添加して、透析、塩析、クロマトグラフィーなどを組み合わせた操作を実施することにより取得することができる。

【 0 0 7 7 】

さらに該膵β細胞分化誘導因子の遺伝子は、マイクロシーケンサーを用いて、上記膵β細胞分化誘導因子の部分アミノ酸配列を決定し、該アミノ酸配列に基づき設計したDNAプローブを用いて、該細胞より作製したcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって取得することができる。

【 0 0 7 8 】

かくして得られる膵β細胞分化誘導因子は、その利用によって、膵β細胞への分化能を有する細胞を膵β細胞に分化誘導することができる。例えば、これを、膵β細胞への分化能を有する細胞の培養用培地に添加して膵β細胞への分化能を有する細胞を培養することによって、所望の膵β細胞を得ることができる。培養条件は、前記2.に記載した通りである。培地への添加量は、通常、約1-400ng/ml培地の範囲から適宜選択することができる。

【 0 0 7 9 】

5. 膵β細胞を含む膵β細胞再生薬または糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患の治療薬

本発明方法に従い分化誘導された膵β細胞或いはその前駆細胞は、膵β細胞再

生薬また耐糖能異常に基づく疾患、例えば耐糖能異常に起因する疾患、例えば、糖尿病またはそれに準ずるImpaired glucose toleranceなどの各種疾患の治療薬として有用である。

【0080】

膵β細胞再生薬および耐糖能異常疾患治療剤は、膵β細胞またはその前駆細胞（膵β細胞への分化能を有する細胞）を高純度で含むものであればよく、また、これを適用すべき患者の膵β細胞の障害部位ならび大きさに応じて、該細胞を増殖させたもの、好ましくは、膵β細胞への分化能を有する細胞から分化させたインスリン産生能を持つβ細胞様細胞を含むものが用いられる。

【0081】

この膵β細胞再生薬の有効成分とする本発明細胞は、例えば患者の骨髓液中から前記1-(1)に示す密度勾配遠心分離法、後記8.に示す膵β細胞への分化能を有する細胞を特異的に認識する抗体を用いたパニング法[J. Immunol., 141(8), 2797-2800 (1988)]もしくはFACS法[Int. Immunol., 10(3), 275-283 (1998)]、または膵β細胞への分化能を有する細胞に特異的な遺伝子のプロモーターを用いたレポーター系を構築する方法により、製造および精製することができる。

【0082】

また該薬剤の有効成分とする細胞には、後記6.に示す膵β細胞形成剤を用いて、該膵β細胞への分化能を有する細胞を膵β細胞へ分化誘導させた細胞、高齢者の骨髓から取得した骨髓由来間葉系細胞に、後記11.に示す不死化方法を適用して、細胞分裂能を賦活させた膵β細胞への分化能を有する細胞も含まれる。

【0083】

本発明膵β細胞再生薬および耐糖能異常疾患治療剤は、通常、処置を必要とする患者に約 10^5 - 10^8 細胞/kg体重、好ましくは約 10^6 - 10^7 細胞/kg体重の範囲で投与することができる。投与経路は、特に制限されないが、好ましくは、門脈注射により障害部位に輸送する方法を挙げることができる。

【0084】

6. 膵β細胞形成剤

本発明の膵β細胞形成剤は、胎児の膵β細胞発生領域で発現している因子ある

いは胎児の膵β細胞発生段階で膵β細胞への分化に働く因子および膵β細胞分化誘導因子の少なくとも一種を有効成分として含有しており、その利用によって膵β細胞への分化能を有する細胞を膵β細胞へ分化誘導させることができる。

【0085】

該膵β細胞形成剤としては、前記3.に詳述した、サイトカイン、接着分子/細胞外基質、生理活性物質、転写因子などをあげることができる。

【0086】

これらは、一般には1-400ng/ml程度の範囲で用いることができる。好ましくはサイトカインは、10-40ng/mlの濃度で用いられる。生理活性物質としてのニコチンアミドは、例えば 10^{-3} Mの濃度で用いられる。接着分子/細胞外基質は、例えばラミニンの場合は、これでコートした培養皿を利用して、該培養皿で膵β細胞への分化能を有する細胞を培養することにより膵β細胞への分化を促進することができる。

【0087】

また、本発明の膵β細胞形成剤には、前記4に記載の膵β細胞分化誘導因子または該膵β細胞分化誘導因子の遺伝子を含むものも包含される。以下、これらにつき詳述する。

【0088】

(1)膵β細胞分化誘導因子をコードする遺伝子を含む膵β細胞形成剤

膵β細胞分化誘導因子をコードする遺伝子を有効成分として含む膵β細胞形成剤について詳述する。

【0089】

まず、膵β細胞分化誘導因子の遺伝子DNA断片あるいは全長cDNAをウイルスベクタープラスミド内のプロモーターの下流に挿入して、組換えウイルスベクタープラスミドを造成する。ここでウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどの公知の各種のものを利用できる。

【0090】

次いで、該組換えウイルスベクタープラスミドを、該ウイルスベクタープラス

ミドに適合したパッケージング細胞に導入する。ここでパッケージング細胞としては、ウイルスのパッケージングに必要な蛋白質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクタープラスミドの該欠損する蛋白質を補給できる細胞であればいかなるものも用いることができる。例えば該パッケージング細胞としては、ヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス線維芽細胞NIH3T3などを用いることができる。

【 0 0 9 1 】

パッケージング細胞で補給する蛋白質としては、レトロウイルスベクターの場合はマウスレトロウイルス由来のgag、pol、envなどの蛋白質、レンチウイルスベクターの場合はHIVウイルス由来のgag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nefなどの蛋白質、アデノウイルスベクターの場合はアデノウイルス由来のE1A、E1Bなどの蛋白質、アデノ随伴ウイルスベクターの場合はRep(p5,p19,p40)、Vp(Cap)などの蛋白質を用いることができる。

【 0 0 9 2 】

ウイルスベクタープラスミドとしては、上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、MODY疾患の原因遺伝子に対する野生型遺伝子を脾β細胞で転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。その具体例としては、例えばMFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)]、pBabePuro [Nucleic Acids Research, 18, 3587-3596 (1990)]、LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG [Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)]、pAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)]などのウイルスベクタープラスミドを挙げることができる。

【 0 0 9 3 】

プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができる。例えば、サイトメガロウイルス（ヒトCMV）のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SRαプロモーターなどを挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーが上記プロモーターと共に用い得る。また、インスリン遺伝子のような脾

β 細胞特異的な遺伝子のプロモーターの利用によれば、膵 β 細胞で特異的に目的の遺伝子を発現させることができる。

【0094】

上記組換えウイルスベクタープラスミドを上記パッケージング細胞に導入する方法(組換えウイルスベクターの生産方法)としては、例えば、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]などをあげることができる。

【0095】

かくして得られる組換えウイルスベクターは、これを遺伝子治療剤に用いる基剤と共に調合して、膵 β 細胞形成剤とすることができる。その調合は文献記載の方法[Nature Genet., 8, 42 (1994)]に従うことができる。遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればいかなるものでも用いることができる。例えば、蒸留水、塩化ナトリウム、塩化ナトリウムと無機塩との混合物などの塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコースなどの溶液、グリシン、アルギニンなどのアミノ酸溶液、有機酸溶液または塩溶液とグルコース溶液との混合溶液などがあげられる。また常法に従い、これらの基剤と共に、助剤として例えば浸透圧調整剤、pH調整剤、ゴマ油、ダイズ油などの植物油またはレシチン、非イオン界面活性剤などの界面活性剤などを用いて、溶液、懸濁液、分散液としての注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥などの操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。かくして得られる膵 β 細胞形成剤は、これが液体の場合はそのまま、固体の場合は治療の直前に必要により滅菌処理をした上記基剤に溶解して、遺伝子治療に使用することができる。該膵 β 細胞形成剤は、カテーテルなどを用いて局所的に投与する方法などによって遺伝子治療に実用することができる。

【0096】

上述した組換えウイルスベクターを試験管内で膵 β 細胞への分化能を有する細胞に感染させて得られる感染細胞を上述した膵 β 細胞形成剤として患者に投与することによっても、本発明遺伝子治療を実施することができる。また、上述した組換えウイルスベクターを患者の患部に直接投与することによっても、所望の遺

伝子治療を実施することができる。

【0097】

(2)蛋白質を有効成分とする膵β細胞形成剤

以下、膵β細胞分化誘導因子を有効成分とする膵β細胞形成剤について詳述する。

【0098】

膵β細胞分化誘導因子の完全長cDNAをもとに、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。該DNA断片または完全長cDNAを発現ベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、該蛋白質の組換え発現ベクターを造成する。該組換え発現ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞内に導入する。

【0099】

宿主細胞としては、目的とするDNAを発現できるものは全て用いることができる。例えば、エシェリヒア (Escherichia) 属、セラチア (Serratia) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、バチルス (Bacillus) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属などに属する細菌、クルイペロミセス (Kluyveromyces) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、シゾサッカロマイセス (Shizosaccharomyces) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、シワニオミセス (Schwannomyces) 属などに属する酵母や動物細胞、昆虫細胞などを用いることができる。

【0100】

宿主細胞の具体例としては、例えば Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、C

orynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110などをあげることができる。

【0101】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、 β 細胞分化誘導因子の遺伝子DNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0102】

細菌を宿主細胞として用いる場合は、 β 細胞分化誘導因子の組換え発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、 β 細胞分化誘導因子をコードするDNAおよび転写終結配列より構成された組換え発現ベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0103】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもペーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Amersham Pharmacia Biotech社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pKYP10 [特開昭58-110600]、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (Stratagene社製)、pGEX (Amersham Pharmacia Biotech社製)、pET-3 (Novagen社製)、pTerm2(USP4686191、USP4939094、USP5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]などを例示することができる。

【0104】

発現ベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6-18塩基）に調節したものをを用いることが好ましい。

【0105】

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター (Plac)、 P_L プロモ

ーター、 P_R プロモーター、T7プロモーターなどの大腸菌やファージなどに由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどをあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター (Ptrp \times 2)、tacプロモーター、letIプロモーター [Gene, 44, 29 (1986)]、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーターなども用いることができる。

【0106】

脾 β 細胞分化誘導因子をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように置換することにより、目的とする蛋白質の生産率を向上させることができる。

【0107】

脾 β 細胞分化誘導因子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

【0108】

組換えベクターの導入方法としては、宿主細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法などをあげることができる。

【0109】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15などを例示することができる。

【0110】

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーターなどをあげることができる。

【0111】

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイペロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスボロン・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius)などをあげることができる。

【0112】

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]などをあげることができる。

【0113】

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pCDNAI (Invitrogen社製)、pCDM8 (Invitrogen社製)、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pCDNAI/Amp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAGE210などを例示することができる。

【0114】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE(immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR α プロモーターなどをあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0115】

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa)細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞などをあげることができる。

【0116】

組換えベクターの導入法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)、Virology, 52, 456 (1973)] などを用いることができる。

【0117】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992)]、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1-38(1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)などに記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

【0118】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

【0119】

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにInvitrogen社製)などをあげることができる。

【0120】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などを用いることができる。

【0121】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, (1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社製)などを用いることができる。

【0122】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] などをあげることができる。

【0123】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第2版 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に記載されている方法などに準じて、分泌生産、融合蛋白質発現などを行うことができる。

【0124】

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

【0125】

膵β細胞分化誘導因子をコードするDNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中に膵β細胞分化誘導因子を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、膵β細胞分化誘導因子を製造することができる。

【0126】

膵β細胞分化誘導因子を産生する形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0127】

大腸菌などの原核生物あるいは酵母などの真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該宿主が資化し得る炭素源、窒素源、無機物などを含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0128】

炭素源としては、それぞれの宿主が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物などの炭水化物、酢酸、プロピオン酸などの有機酸、エタノール、

プロパノールなどのアルコール類を用いることができる。

【0129】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの各種無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物などが用いられる。

【0130】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウムなどを用いることができる。

【0131】

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15-40℃がよく、培養時間は、通常16時間-7日間とすることができる。培養中、pHは3.0-9.0に保持するのがよい。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行い得る。また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

【0132】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG)などを、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA)などを培地に添加してもよい。

【0133】

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダ

ルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清などを添加した培地などを用いることができる。

【 0 1 3 4 】

培養は、通常pH6-8、30-40℃、5%CO₂存在下の条件下で1-7日間行うことができる。培養中、必要に応じて、カナマイシン、ペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

【 0 1 3 5 】

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 (Pharmingen社製)、Sf-900 II SFM培地 (Life Technologies社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれもJRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] などを用いることができる。

【 0 1 3 6 】

培養は、通常pH6-7、25-30℃の条件下で、1-5日間行うことができる。

【 0 1 3 7 】

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

【 0 1 3 8 】

上述の形質転換体の培養物から、膵β細胞分化誘導因子を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。例えば、膵β細胞分化誘導因子が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁させた後、超音波破碎機などにより細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離して得られる上清から、通常の蛋白質の単離精製法、例えば、溶媒抽出法、硫酸などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEA)-セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製)などの樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(Amersham Pharmacia Biotech社製)などの樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどの樹脂を

用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【 0 1 3 9 】

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、細胞を回収後、破碎し、遠心分離することにより、沈殿画分として蛋白質の不溶体を回収する。回収した該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、希釈あるいは透析により、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、該蛋白質の構造を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該蛋白質の精製標品を得る。

【 0 1 4 0 】

膵β細胞分化誘導因子またはその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清から、該蛋白質またはその糖鎖付加体などの誘導体を回収することができる。例えば、培養物から遠心分離などの手法により培養上清を回収し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【 0 1 4 1 】

また、上記各方法により発現させた蛋白質は、そのアミノ酸配列に基づいて、別個にFmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)などの化学合成法に従って製造することができる。また、米国Advanced ChemTech社製、Perkin-Elmer社製、Amersham Pharmacia Biotech社製、米国Protein Technology Instrument社製、米国Synthecell-Vega社製、米国Perspective社製、島津製作所社製などのペプチド合成機を利用して合成することもできる。

【 0 1 4 2 】

膵β細胞への分化を誘導できる蛋白質は、前記6-(1)と同様にして膵β細胞形成剤として実用できる。

【 0 1 4 3 】

7. 先天性遺伝子疾患の治療への利用

糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患の中には、単一遺伝子の変異により、本来膵β細胞の分化または維持に必要な蛋白質の一部が欠損するために耐糖能異常となる一群がある。このような疾患の代表例には、MODY(maturity onset diabetes of the young)が含まれる。この疾患は、ミオシン、トロポニン、トロポミオシン、電位依存性Naチャンネル、Kチャンネル、フィブリン、エラステイン、ミトコンドリア、ジストロフィンなどの遺伝子異常が原因であることが知られている。

【0144】

上記疾患患者を治療する方法としては、疾患患者より膵β細胞への分化能を有する細胞を取得し、該細胞に正常な遺伝子を導入したのち、膵β細胞に移植する方法があげられる。正常な遺伝子は、前記6-(1)に記載した遺伝子治療用ベクターに挿入した後、膵β細胞への分化能を有する細胞に導入することができる。

【0145】

8. 膵β細胞への分化能を有する細胞特異的な表面抗原を認識する抗体

以下、本発明膵β細胞への分化能を有する細胞が発現している表面抗原を認識する抗体について詳述する。

【0146】

本発明膵β細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している表面抗原を認識する抗体は、耐糖能異常による疾患の細胞治療を実施する上で必要な膵β細胞への分化能を有する細胞の純度検定や精製に用いることができる。

【0147】

該抗体を取得する方法としては、本発明の膵β細胞への分化能を有する細胞 $3-5 \times 10^5$ 細胞/匹あるいは該細胞から調製した細胞膜面分1-10mg/匹程度を抗原として、ウサギ、ヤギ、3-20週齢ラット、マウス、ハムスターなどの非ヒト哺乳動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバント[例えば、フロイドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)または水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチンなど]とともに投与する。

【0148】

該抗原の投与は、1回目の投与の後1-2週間おきに3-10回行う。各投与後、3-7日目に眼底静脈叢より採血し、得られる血清が免疫に用いた抗原と反応するか否かを酵素免疫法(ELISA法：医学書院刊、1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)などで調べる。

【0149】

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、血清または抗体産生細胞の供給源とする。

【0150】

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製できる。

【0151】

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒト哺乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

【0152】

抗体産生細胞としては、脾細胞、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞、特に脾細胞が好適に用いられる。

【0153】

骨髓腫細胞としては、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髓腫細胞株であるP3-X63Ag8-U1(P3-U1)株 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41(NS-1)株 [European J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2)株 [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653)株 [J. Immunology, 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63)株 [Nature, 256, 495 (1975)]などのマウス由来の株化細胞が好適に用いられる。

【0154】

ハイブリドーマ細胞は、以下の方法により作製できる。即ち、抗体産生細胞と骨髓腫細胞を混合し、HAT培地(正常培地にヒポキサンチン、チミジンおよびアミノプテリンを加えた培地)に懸濁した後、7-14日間培養する。培養後、培養上清の一部を採り酵素免疫測定法などにより抗原に反応し抗原を含まない蛋白質に

は反応しない細胞を選択する。次いで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞として選択する。

【0155】

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、硫酸沈殿、カプリル酸沈殿や、DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラム、ゲル濾過カラムなどを用いるクロマトグラフィーなどを、単独または組み合わせて行う方法があげられる。

【0156】

上記方法で取得した、該 β 細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原を認識する抗体を用いて、検体細胞に対する反応性と造血系幹細胞、神経系幹細胞などの対照となる細胞に対する反応性とを比較することで、検体細胞が上記表面抗原を発現しているかどうかを容易に検定することができる。

【0157】

9. 脾 β 細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原および該表面抗原をコードする遺伝子の取得

脾 β 細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している表面抗原遺伝子の取得方法としては、二つの異なる由来のサンプル間で異なる発現形態を取る遺伝子を取得する方法であるサブトラクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5738-5742 (1988)]や、Representational difference analysis[Nucleic Acids Research, 22, 5640-5648 (1994)]による方法をあげることができる。

【0158】

まず、脾 β 細胞への分化能を有する細胞より作製したcDNAライブラリーを、造血系幹細胞や神経系幹細胞などの脾 β 細胞への分化能を有する細胞以外の対照細胞より取得したmRNAを用いてサブトラクションを行う。脾 β 細胞への分化能を有する細胞特異的な遺伝子を濃縮した差分化cDNAライブラリーを調製した後、該差分化cDNAライブラリーの挿入cDNA配列を5'末端側よりランダムに塩基配列解析を行い、分泌シグナル配列を持つものだけを選択する(ランダム配列解析)。このようにして得られたcDNAの全長塩基配列を決定することにより、該cDNAがコード

する蛋白質が分泌蛋白質か膜蛋白質かを区別することができる。

【0159】

上記の方法において、ランダム配列解析の代わりに、シグナルシーケンスストラップ法も用いることもできる [Science, 261, 600-603 (1993); Nature Biotechnology, 17, 487-490 (1999)]。シグナルシーケンスストラップ法とは、分泌シグナル配列をもつ遺伝子を選択的にスクリーニングする方法である。

【0160】

効率よく特異的な表面抗原を取得するためには、シグナルシーケンスストラップライブラリーをサブトラクションが行い得るベクターを用いて作製し、脾β細胞への分化能を有する細胞から作製したシグナルシーケンスストラップライブラリーを造血系幹細胞や神経系幹細胞などの対照となる細胞より取得したmRNAを用いてサブトラクションを行う方法が望ましい。このようにして取得された分泌シグナル配列を含むDNA断片は全長cDNAをクローン化するためのプローブとして用いることができる。

【0161】

全長cDNAはその全長塩基配列を解析することで、該cDNAがコードする蛋白質が分泌蛋白質か膜蛋白質かを区別することができる。

【0162】

ランダム配列解析あるいはシグナルシーケンスストラップ法を用いた場合でも、得られたクローンが膜蛋白質をコードする場合は、塩基配列から類推されるアミノ酸配列に基づき合成ペプチドを作製し、該合成ペプチドを抗原として上記方法により特異的な抗体を取得することができる。

【0163】

また、膜蛋白質の場合は、受容体をコードしているものがある。このような受容体は脾β細胞への分化能を有する細胞の特異的な増殖または脾β細胞への分化の調節に働いている可能性があり、当該受容体のリガンドの探索に用いることができる。分泌蛋白質の場合は、直接脾β細胞への分化能を有する細胞を増殖あるいは分化させるために用いることができる。

【0164】

10. 膵β細胞の形成を促進する候補物質のスクリーニング

本発明は、膵β細胞の形成(分化誘導)を促進する活性を有する候補物質のスクリーニング方法をも提供する。該スクリーニング方法は、膵β細胞への分化能を有する間葉系細胞を無血清培地中で培養させる際に、候補物質を培養系内に添加存在させ、その存在が膵β細胞の形成を促進するか否か、即ち分化誘導される膵β細胞レベルを調べることにより実施できる。

【0165】

候補物質としては、各種サイトカイン、増殖因子などの分泌蛋白質、細胞接着分子/細胞外基質などの膜結合蛋白質、組織抽出液、合成ペプチド、合成化合物、微生物培養液などを挙げることでよい。

【0166】

膵β細胞乃至その前駆細胞の増殖能力はコロニー形成能やBrdUの取り込みなどで調べることができる。

【0167】

コロニー形成能は、本発明の膵β細胞への分化能を有する細胞を低密度で播種することにより調べることができる。

【0168】

BrdUの取り込みは、BrdUを特異的に認識する抗体を用いた免疫染色により調べることができる。

【0169】

膵β細胞への分化を評価する方法としては、細胞のインスリン産生を指標とする方法、細胞内に導入したレポーター遺伝子の発現を指標とする方法などがあげられる。

【0170】

レポーター遺伝子の発現を指標とする方法は、膵β細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーターとレポーター遺伝子とを組み込んだベクターDNAを膵β細胞への分化能を有する細胞に導入し、該細胞を用いてレポーター遺伝子の発現を調べる方法である。

【0171】

レポーター遺伝子としては、GFP(Green fluorescent protein)、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼをコードする遺伝子などがあげられる。

【0172】

膵β細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーターとしては、インスリンがあげられる。

【0173】

11. 膵β細胞への分化能を有する細胞の不死化

糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患などの耐糖能異常に基づく疾患の患者、特に高齢者に対して本発明の治療薬を投与する場合、本発明の膵β細胞への分化能を有する細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やすことが望ましい。

【0174】

細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やす方法としては、テロメラーゼを本発明の膵β細胞への分化能を有する細胞に発現させる方法をあげることができる。

【0175】

テロメラーゼを本発明の膵β細胞への分化能を有する細胞に発現させる方法としては、テロメラーゼの触媒サブユニットであるTERT遺伝子をレトロウイルスベクターに導入し、該ベクターを膵β細胞への分化能を有する細胞に導入する方法、膵β細胞への分化能を有する細胞に内在するTERT遺伝子を誘導発現させる因子を膵β細胞への分化能を有する細胞に投与する方法、TERT遺伝子を誘導発現させる因子をコードするDNAを含むベクターを膵β細胞への分化能を有する細胞に導入する方法などをあげることができる。

【0176】

上述のTERT遺伝子を誘導発現させる因子は、TERT遺伝子プロモーターとGFP(Green Fluorescent protein)、ルシフェラーゼあるいはベクターガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子とを組み込んだベクターDNAを膵β細胞への分化能を有する細胞に導入することにより、TERT遺伝子を誘導発現させる因子を選別することができる。

【0177】

12. 脾β細胞への分化能を有する細胞を抗体を用いて分離する方法

生体内から取り出した各種組織から目的の表面抗原を発現している細胞を取得する方法としては、ソーティング機能を有したフローサイトメーターを用いる方法、磁気ビーズを用いる方法があげられる。

【0178】

フローサイトメーターのソーティングの方式としては、水滴荷電方式、セルキャプチャー方式などがあげられる（フローサイトメーター自由自在、p14-23、秀潤社、1999年）。どちらの方法も、細胞の表面に発現している分子に結合した抗体から発せられる蛍光強度を電気信号に変換することにより抗原の発現量を定量することができる。また、使用する蛍光の種類を組み合わせることで、複数の表面抗原を利用して分離することも可能である。蛍光としては、FITC(fluorescein isothiocyanate)、PE(phycoerythrin)、APC(Allo-phycocyanin)、TR(TexasRed)、Cy3、CyChrome、Red613、Red670、PerCP、TRI-Color、QuantumRedなどがあげられる（フローサイトメーター自由自在、p.3-13、秀潤社、1999年）。

【0179】

染色方法としては、生体内から取り出した各種組織、具体的には骨髄または脾臓から、遠心分離などの方法で細胞を分離した後、直接抗体で染色する方法、一度適当な培地中で培養・増殖を行った後に抗体で染色する方法があげられる。

【0180】

細胞の染色はまず、表面抗原を認識する一次抗体と目的の細胞サンプルを混合し、氷上で30分間-1時間インキュベートする。一次抗体が蛍光で標識されている場合には、洗浄後フローサイトメーターで分離を行う。一次抗体が蛍光標識されていない場合には、洗浄後一次抗体に対して結合活性を有する蛍光標識された二次抗体と一次抗体が反応した細胞とを混合し、再び氷上で30分間-1時間インキュベートする。洗浄後、一次抗体と二次抗体で染色された細胞をフローサイトメーターで分離する。

【0181】

磁気ビーズを用いる方法では、目的の表面抗原を発現している細胞を大量に分離することができる。分離の純度は上述のフローサイトメーターを用いる方法に

は及ばないが、精製を繰り返すことにより、十分高い細胞純度を確保することができる。

【0182】

細胞に一次抗体を反応させた後、細胞と反応しなかった一次抗体を除去し、一次抗体と特異的に結合する磁気ビーズを結合させた二次抗体を結合させる。残存する二次抗体を洗浄除去した細胞は磁石を設置したスタンドで分離することができる。これらの操作に必要な材料および装置はDYNAL社から入手することができる。

【0183】

磁気ビーズを用いる方法は、細胞サンプル中より不要な細胞を除去するのにも同様に利用することができる。不要な細胞をより効率的に除去するにはStem Cell Technologies Inc(Vancouver, Canada)より販売されているStemSep法を用いることができる。

【0184】

上述の方法で用いられる抗体としては、前記8.で取得した抗体または造血系細胞の表面抗原であるCD34、CD117、CD14、CD45、CD90、Sca-1、Ly6c、Ly6gを認識する抗体、血管内皮細胞の表面抗原であるFlk-1、CD31、CD105、CD144を認識する抗体、間葉系細胞の表面抗原であるCD140を認識する抗体、インテグリンの表面抗原であるCD49b、CD49d、CD29、CD41を認識する抗体、マトリックス受容体であるCD54、CD102、CD106、CD44を認識する抗体があげられる。これらの抗体を組み合わせることで、より高い純度で目的の細胞を取得することができる。

【0185】

具体的には、CD34陰性、CD117陽性、CD144陰性細胞およびCD140陽性の性質を有する細胞を取得するには、ヒト骨髓由来間葉系細胞からCD34陽性細胞とCD144陽性細胞を上述した免疫磁気ビーズの方法などを利用して除去した後、CD117陽性およびCD140陽性の細胞画分を分取することで目的の細胞を分離することができる。

【0186】

13. 膵β細胞特異的遺伝子のプロモーターレポーターベクターを用いた膵β細胞

胞前駆細胞の分離

膵 β 細胞への分化能を有する細胞から誘導した膵 β 細胞または膵 β 細胞の前駆細胞を効率的に分離するために、発光オワンクラゲの緑色蛍光蛋白質(green fluorescent protein; GFP)を遺伝子導入のためのレポーター遺伝子の指標として用いることができる。

【0187】

具体的には、膵 β 細胞で特異的に発現している遺伝子または前記9.で取得した膵 β 細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している遺伝子のプロモーターの下流にGFP遺伝子をつないだベクターを作製し、膵 β 細胞への分化能を有する細胞に導入する。このようなレポーターベクターを導入された細胞を薬剤耐性などの指標で分離後、膵 β 細胞へと分化誘導する。分化誘導した細胞はGFPを発現し、蛍光を発生する。蛍光を発生した膵 β 細胞ならびに膵 β 細胞前駆細胞はフローサイトメーターを用いて容易に分離することができる(フローサイトメーター自由自在、p.44-52、秀潤社、1999年)。

【0188】

膵 β 細胞で特異的に発現している遺伝子のプロモーターとしてはインスリン、paxなどを用いることができる。

【0189】

ベクターとしては、上述した動物細胞用のプラスミドベクター、アデノウイルスベクターなどを用いることができる。

【0190】

14. Hoechst 33342を用いた膵 β 細胞への分化能を有する細胞の分離

Hoechst 33342はDNA結合色素であり、生きたままの細胞を染色することができる。骨髓由来間葉系細胞の大多数は激しく分裂しているため、非常に明るく染色されるが、未熟な細胞ほど暗く染まる。このことは、細胞が未熟なほど、ABC (ATP binding cassette)トランスポーターによる色素排除能力が大きいことを示す文献の記載(中内啓光、蛋白質核酸酵素、Vol.45, No.13, 2056-2062, 2000)から支持される。従って、Hoechst 33342を用いて供試細胞を染色して、染色されない(Hoechst33342を取り込まない)細胞を分離することによって、本発明の膵 β

細胞への分化能を有する細胞を単離することができる。

【0191】

具体的には、例えば、骨髓由来間葉系細胞をHoechst 33342で染色した後、FACSを用いてUVレーザーをあてて短波長と長波長の2重染色解析を行うことによって、骨髓中からHoechst 33342で暗く染まる細胞を分離することができる。Hoechst 33342を取り込まない未熟な細胞は、Side populationとして分画することができる[Goodell, MA et al. J. Exp. Med., 183, 1797-1806 (1996)、<http://www.bcm.tmc.edu/genetherapy/goodell/new#site/index2.html>参照]。

【0192】

以上詳述したとおり、本発明によれば、膵β細胞の破壊ならびに変性に伴う糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患などの耐糖能異常に基づく疾患の治療ならびに治療薬の探索に有効な間葉系細胞およびこれに由来する膵β細胞が提供される。また本発明によれば、該細胞の膵β細胞への分化に有用なサイトカイン、転写因子、生理活性物質、接着分子/細胞外基質などの膵β細胞形成剤およびこれらの利用法が提供される。

【0193】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明を具体的に示す。

【0194】

【実施例1】マウス骨髓からの膵β細胞への分化能を有する骨髓由来間葉系細胞の取得と培養

5週齢のC3H/Heマウス10匹をエーテルを用いて麻酔後、頸椎脱臼により致死させた。マウスを半側臥位にして、70%エタノールを十分かけ消毒した。

【0195】

次に、大腿骨周辺の皮膚を広範囲にわたり切開し、大腿骨全面の大腿四頭筋をはさみで切除した。股関節の部分にはさみを入れ、関節をはずし、さらに大腿骨背面の筋肉を切除した。股関節の部分にはさみをいれ、関節をはずし、大腿骨を取り出した。大腿骨に付着している筋肉をはさみで切除し、大腿骨全体を露出させた。大腿骨の両端をはさみで切断後、テルモ製23Gの針を装着した2.5ml注射器

に20%FCSを含有するIMDM培地を約1.5ml入れ、注射針の先端を大腿骨の膝関節側の断端に差し込み、試験管の中に培養液を吹き出すことで、骨髓由来間葉系細胞を押し出した。

【0196】

取得した細胞を、20%FCS、100mg/mlペニシリン、250ng/mlストレプトマイシンおよび85mg/mlアムフォテリシン(amphotericin)を含有するIMDM培地中、33℃下に5%CO₂濃度のインキュベーターを用いて培養した。継代を続けることで、細胞は間葉系細胞へと均一化し、造血系の細胞は消失した。

【0197】

約4ヶ月間、上記条件で培養を行い、不死化した細胞を選択した後、希釈により192種類の独立した単一細胞由来の細胞株を取得した。これらの細胞株のうち、膵β細胞への分化能を有する骨髓由来間葉系細胞の一つを、「KUSA/A1」と命名した。以後、骨髓由来間葉系細胞KUSA/A1は、特に指定しない限り、10%FCS、100mg/mlペニシリンおよび250ng/mlストレプトマイシンを含有するDMEM培地中、33℃下に5%CO₂濃度のインキュベーターを用いて培養した。

【0198】

【実施例2】 骨髓由来間葉系細胞から膵β細胞への分化の誘導

実施例1で得られたKUSA/A1細胞を、トリプシン処理して、6ウエルディッシュ(FALCON社製)に細胞密度がなるべく低密度となるようにしながら移乗させた。

【0199】

この細胞を、インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、ブトレシンおよびセレンウムを含む無血清DMEM培地および10%FBSを含有するDMEM培地のそれぞれで、33℃下に5%CO₂濃度のインキュベーターを用いて、12日間培養した。

【0200】

無血清培地および血清含有培地を用いた各ウエルのそれぞれ一つずつに、bFGF(Recombinant Human Basic Fibroblast Growth Factor, R&D社製)を最終濃度が10nm/mlとなるように加えた。以後、特別に指定しない限り、同様の条件で、培地を2日ごとに交換しながら細胞培養を行った。

【0201】

12日間の培養のあと、全てのウエルについて培地を捨て、PBSを用いてウエルごと細胞を3度繰り返し洗浄した。洗浄後、全てのウエルに新たにPBSを2ml加え、2時間、33℃下に5%CO₂濃度のインキュベーターを用いて培養した。

【0202】

2時間の培養後、PBSを廃棄し、新たに24.8mMグルコースを含有するDMEMを2ml加え、さらに2時間、33℃下に5%CO₂濃度のインキュベーターを用いて培養した。

【0203】

グルコース添加後、2時間で培養を終え、次いで、各ウエルの上清をピペットを用いて約2mlずつチューブ(collection tube)に収集した。

【0204】

これらの各上清サンプルについて、ELISA法(インスリン測定キット、MORINAGA社製)を用いて、インスリン濃度を計測した。

【0205】

その結果、bFGFおよびインスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、ブトレシンおよびセレンウムを含む無血清DMEM培地で培養した細胞の上清については、223pg/mlのインスリンを検出した。一方、bFGFおよび10%FBSを含有するDMEM培地で培養した細胞の上清については、インスリンは、検出されなかった(測定感度以下、即ち39pg/mL以下であった)。

【0206】

さらに、bFGFを含まず、インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、ブトレシンおよびセレンウムを含む無血清DMEM培地で培養した細胞の上清については、51.9pg/mlでインスリンが検出された。これに対して、bFGFを含まず10%FBSを含有するDMEM培地で培養した細胞の上清については、インスリンは検出されなかった(測定感度以下)。

【0207】

コントロールとして、ウエルの洗浄に用いたPBSおよび洗浄後にウエルに加えるのに用いた24.8mMグルコースを含有するDMEMについても、同様の方法を用いてインスリン濃度を測定したが、これらのインスリン濃度は、測定感度以下であった。

【0208】

【実施例3】 KUSA/A1細胞の表面抗原の解析

骨髓中から効率的に脾β細胞形成能を有する細胞を単離、精製するために、KUSA/A1の表面抗原の解析を行った。

【0209】

解析に用いたのは、血管内皮細胞の表面抗原として知られているCD105、Flk-1、CD31およびCD144、造血系細胞の表面抗原として知られているCD34、CD117(c-kit)、CD14、CD45、CD90、Ly6A/E(Sca-1)、Ly6cおよびLy6g、間葉系細胞の表面抗原として知られているCD140、インテグリンCD49b、CD49dおよびCD29、マトリックス受容体CD54、CD102、CD106およびCD44の20種類である。

【0210】

まずKUSA/A1細胞の各 1×10^4 個を96ウェルU字プレートにそれぞれ分注した。公知の方法〔酵素抗体法：学際企画刊(1985)〕でビオチン標識した抗マウスCD105抗体(Pharmingen社製)をFACS用緩衝液(1%BSA-PBS、0.02%EDTA、0.05% NaN_3 、pH 7.4)に加え各ウェルに添加し、氷中で30分間反応させた。コントロール抗体としては、ラットIgG2a、κ精製抗体(Pharmingen社製)を用いた。緩衝液で2回洗浄後、ストレプトアビジン-PE(日本ベクトン・ディッキンソン社製)を $20 \mu\text{l}$ 加えた。遮光し氷中で30分間反応後、緩衝液で3回洗浄し、最終的に $500 \mu\text{l}$ に懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定し、抗体の添加により蛍光強度が増加するか否かで抗体の発現の有無を調べた。その結果、KUSA/A1細胞はCD105陰性であることが確認された。

【0211】

Flk-1抗原の発現についても、上記と同様の方法によりビオチン化した抗マウスFlk-1抗体(Pharmingen社製; PM-28181D)を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はFlk-1陰性であることが確認された。

【0212】

CD31抗原の発現については、FITC標識された抗マウスCD31抗体(Pharmingen社製; PM-01954D)を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した。

。その結果、KUSA/A1細胞はCD31陰性であることが確認された。

【0213】

CD144抗原の発現については、ビオチン化した抗マウスCD144抗体 (Pharmingen社製; PM-28091D)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はCD144陰性細胞であることが確認された。

【0214】

CD34抗原の発現については、FITC標識された抗マウスCD34抗体 (Pharmingen社製; PM-09434D)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はCD34陰性であることが確認された。

【0215】

CD117 (c-kit)抗原の発現については、FITC標識された抗マウスCD117抗体 (Pharmingen社製; PM-01904D)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はCD117陰性であることが確認された。

【0216】

CD14抗原の発現については、FITC標識した抗マウスCD14抗体 (Pharmingen社製; PM-09474)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はCD14陽性であることが確認され、BMSC細胞はCD14陰性であることが確認された。

【0217】

CD45抗原の発現については、FITC標識した抗マウスCD45抗体 (Pharmingen社製; PM-01114)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はCD45陰性であることが確認された。

【0218】

CD90抗原の発現については、FITC標識した抗マウスCD90抗体 (Pharmingen社製; PM-22214)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はCD90陰性であることが確認された。

【0219】

Ly6A/E(Sca-1)抗原の発現については、FITC標識した抗マウスLy6A/E(Sca-1)抗体 (Pharmingen社製; PM-01164A)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメータ

ーで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はLy6A/E(Sca-1)陽性であることが確認された。

【0220】

Ly6c抗原の発現については、FITC標識した抗マウスLy6c抗体 (Pharmingen社製 ; PM-01152)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はLy6c陽性であることが確認された。

【0221】

Ly6g抗原の発現については、FITC標識した抗マウスLy6g抗体 (Pharmingen社製 ; PM-01214)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はLy6g陰性であることが確認された。

【0222】

CD140抗原の発現については、ビオチン化した抗マウスCD140抗体 (Pharmingen社製 ; PM-28011A)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はCD140陽性であることが確認された。

【0223】

CD49b抗原の発現については、FITC標識した抗マウスCD49b抗体 (Pharmingen社製 ; PM-09794)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はCD49b陽性であることが確認された。

【0224】

CD49d抗原の発現については、FITC標識した抗マウスCD49d抗体 (Pharmingen社製 ; PM-01274)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果、KUSA/A1細胞はCD49d陰性であることが確認された。

【0225】

【実施例4】 脾β細胞への分化能を有するマウス骨髓由来間葉系細胞でのテロメラーゼ活性

脾β細胞への分化能を有するマウス骨髓由来間葉系細胞のテロメラーゼ活性は Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)法により検討した (Oncor社製 TRAPeze Telomerase Detection Kit使用)。テロメラーゼ活性の測定は原則的に添付されていたプロトコールに従い、具体的には以下の通り行った。

【0226】

即ち、まず、6cm径の培養皿上で培養した膵β細胞への分化能を有するマウス骨髄由来間葉系細胞（およそ 10^6 個）をPBSで洗浄後、200μlの1×CHAPS液を加え、氷上で30分間静置した。その後、溶液と共に細胞を1.5ml容遠沈管に回収し、14,000rpmで20分間遠心分離（4℃、HITACHI社製himacCF15）し、上清を細胞抽出液として回収した。Protein assay（BioRad社製）を用いて蛋白質含有量を測定したところ、上記条件で取得した膵β細胞への分化能を有するマウス骨髄由来間葉系細胞の細胞抽出液はおよそ1mg/mlであった。

【0227】

次にこの細胞抽出液を用いて、プロトコールに従ってテロメア伸長反応およびPCR増幅を行った。TaqポリメラーゼはEX Taq polymerase（宝酒造製）を用いた。反応終了後の試料は10×染色液（0.25% bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF, 30% glycerol）を1/10量添加し、12.5%ポリアクリルアミドゲル（TRAPeze T elomerase Detection Kitのプロトコールに記載されている通り調製）に載せ、250mV定電圧下で泳動した。泳動後、ゲルをサイバーグリーン（FMC社製）で染色し、蛍光色素分析装置、FluoroImager（Molecular Dynamics社製）を用いて解析した。その結果、細胞抽出液の終濃度が0.4-4μg/mlの試料でテロメラーゼ活性が検出された。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 間葉系細胞から、糖尿病などの耐糖能異常に基づく疾患などの治療に有効な膵β細胞を形成する方法、該方法によって得られる膵β細胞を有効成分とする耐糖異常疾患の治療剤、該方法に利用するサイトカインなどの膵β細胞形成剤、間葉系細胞からの膵β細胞の形成を促進する候補化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られる膵β細胞形成促進物質を提供する。

【解決手段】 哺乳動物由来の間葉系細胞を起源細胞として、例えば膵β細胞形成剤の存在下に該細胞を培養し、得られる膵β細胞を該細胞で特異的に発現する遺伝子を選択マーカーとして選択、分離することを特徴とする間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法。

【選択図】 なし

特2002-115201

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000206956]

1. 変更年月日	1990年 8月27日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区神田司町2丁目9番地
氏 名	大塚製薬株式会社